

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1]a) A pyruvate kinase, b glycerol kinase, c glycerol triphosphoric acid oxidase, d) A constituent for sodium ion measurement containing peroxidase, e reduction type chromogen, f adenosine diphosphate or its salt and g phosphoenolpyruvic acid, or its salt.

[Claim 2]A constituent for sodium ion measurement which contains the following constituent A and the constituent B, and is characterized by things.

Aa) A constituent containing a pyruvate kinase, b glycerol kinase, c glycerol triphosphoric acid oxidase, d peroxidase, e reduction type chromogen, f adenosine diphosphate or its salt and g phosphoenolpyruvic acid, or its salt.

Ba) A constituent containing a glutamate dehydrogenase, b glucose dehydrogenase and c reduction type nicotine ADENINJI nucleoside (NADH), or reduction type nicotine adenine dinucleoside phosphate (NADPH).

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]This invention relates to the constituent for sodium ion measurement. In the case so that the sodium ion measurement in body fluid may cause malfunction of moisture and the electrolyte metabolism. That is, clinical meaning is deep as what gives the useful information on acidosis at the time of starvation, perspiration, heatstroke, diarrhea, a pituitary adrenal system functional disorder, cardiac insufficiency, renal failure, nephrotic syndrome, and steroid hormone administration.

[0002]

[Description of the Prior Art]Conventionally, as a measuring method of a metal ion, the flame photometer method, the chemical measurement method, and the ion selective electrode method have been used including sodium ion. However, a flame photometer method has complicated operation and there was a problem in the throughput of a sample. A chemical measurement method has the problem that a reagent is expensive, and is seldom actually used for the top where operation is complicated at the spot of the clinical laboratory test. Although an ion selective electrode method is comparatively easy to operate, there is a problem of producing an error at the time of measurement for degradation of an electrode.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The purpose of this invention is to provide the constituent for enzymatic measurement of the sodium ion concentration excellent in operativity, fixed-quantity nature, and accuracy in view of the above-mentioned actual condition.

[0004]

[Means for Solving the Problem]A place where this invention persons examined wholeheartedly how to measure sodium ion concentration in a sample using an enzyme activated by sodium ion, It found out that it was possible to quantify adenosine triphosphate produced by the reaction using a pyruvate kinase using glycerol kinase, glycerol triphosphoric acid oxidase, and peroxidase.

[0005]A gist of an invention of the 1st of this invention Namely, a) pyruvate kinase, b) Glycerol kinase, c) glycerol triphosphoric acid oxidase, d) Consist in a constituent for sodium ion measurement containing peroxidase, e) reduction type chromogen, f) adenosine diphosphate or its salt and g) phosphoenolpyruvic acid, or its salt.

[0006]Although it was usually satisfactory in any way, when a sample was measured using this system of measurement, and ammonium ion was added superfluously, it turned out that it has influence of positive. Then, when it worked on an influence evasion measure of ammonium ion, it found out that low-concentration ammonium ion was effectively eliminable by using a glutamate dehydrogenase. However, when measuring a sample by which high-concentration ammonium ion was added, in order to eliminate ammonium ion thoroughly, it turned out that high-concentration NADH or NADPH needs to be added. Since NADH or NADPH has a reducing action, existence of high-concentration NADH or NADPH has influence of negative on a coloring reaction system which uses peroxidase, and sufficient sensitivity is no longer obtained.

[0007]Then, as a result of inquiring further, it found out that it was possible to use for a reaction using glucose dehydrogenase NADH or NADPH which oxidizes by the reaction using a glutamate dehydrogenase. That is, it came to complete the system of reaction which eliminates high-concentration ammonium ion effectively using low-concentration NADH or NADPH by making NADH or NADPH recycle.

[0008]It came to complete a sodium ion system of measurement with higher accuracy by including this ammonium ion elimination system of reaction in a system of measurement of the above-mentioned sodium ion.

[0009]That is, a gist of an invention of the 2nd of this invention contains the following constituent A and [http://www4.ipdl.inpit.go.jp/cgi-bin/tran\\_web.cgi\\_eije?atw\\_u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.inpit.go...](http://www4.ipdl.inpit.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_eije?atw_u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.inpit.go...) 2009/09/28

the constituent B, and it consists in a constituent for sodium ion measurement characterized by things.

Aa) Constituent containing a pyruvate kinase, b glycerol kinase, c glycerol triphosphoric acid oxidase, d peroxidase, e reduction type chromogen, f adenosine diphosphate or its salt and g phosphoenolpyruvic acid, or its salt.

Ba) Constituent containing a glutamate dehydrogenase, b glucose dehydrogenase and c reduction type nicotine ADENINJ nucleoside (NADH), or reduction type nicotine adenine dinucleoside phosphate (NADPH).

The above-mentioned constituent B is a constituent for ammonium ion elimination, and can eliminate high-concentration ammonium ion effectively.

[0010] As a method of measuring sodium ion using a pyruvate kinase, Although there is a method of using pyruvate oxidase for pyruvic acid produced by the reaction using a pyruvate kinase, making hydrogen peroxide generate, making generate a chromogen, and the bottom of peroxidase coexistence and quinoid coloring matter, and carrying out colorimetry, This method is difficult to be easy to be influenced by endogenous pyruvic acid, and to use commercially, since cost of pyruvate oxidase is high.

[0011] Although a method of eliminating ammonium ion combining a glutamate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase as a method of eliminating ammonium ion using constituents other than this invention is mentioned, Isocitric acid used as a substrate of isocitrate dehydrogenase of what can eliminate ammonium ion effectively in this method is more expensive than glucose, and in order to suspend a reaction of isocitrate dehydrogenase, addition of a metal chelator is required, but. Since addition of a metal chelator has influence of negative on measurement of sodium ion, it is necessary whether it does not stop at measurement of sodium ion, but can do in measurement of a metal ion, and to restrict addition.

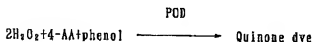
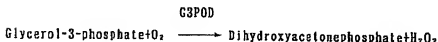
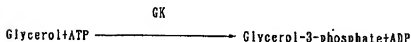
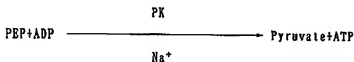
[0012] Therefore, in sodium ion measurement, use of these methods is commercially difficult, and a method of measuring sodium ion using a constituent of this invention is excellent in an accuracy, accuracy, simple nature, and cost target.

[0013] A thing using the system of reaction illustrated below as a method of measuring sodium ion in a sample is mentioned using the above-mentioned constituent.

[0014]

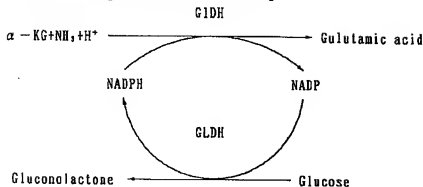
[Formula 1]

(ナトリウムイオン測定系)



[0015]

[Formula 2]



PEP phosphoenolpyruvic acid GK. Glycerol-kinase ADP adenosine diphosphate G3POD glycerol triphosphoric acid oxidase ATP adenosine triphosphate POD peroxidase 4-AA 4-aminoantipyrine G1DH glutamate dehydrogenase alpha-KG. \*\*ketoglutaric acid GLDH Glucose-dehydrogenase PK pyruvate kinase [0016]The origin in particular of the pyruvate kinase used for this invention is not limited, and may use what is obtained, for example from rabbit muscles or the muscles of a cow. The thing of rabbit muscular origin is used suitably. It is not limited and especially the origin of the glycerol kinase used for this invention is *Candida*, for example. The thing and *Cellulomonas* of the Miko Delmas (*CandidaMycooderma*) origin The thing of the Espy (*Cellulomonas* sp.) origin is used. Suitably, the thing of *Cellulomonas* sp. origin is used. Although the origin in particular of the glycerol triphosphoric acid oxidase used for this invention is not limited, a thing from microorganism is used suitably. Although the origin in particular of the peroxidase used for this invention is not limited, the thing of horseradish origin is used suitably. Although the origin in particular of the glutamate dehydrogenase used for this invention is not limited and the thing of the liver origin of bacteria, yeast, and a cow is used, the thing of bacteria origin is used suitably. Although the origin in particular of the glucose dehydrogenase used for this invention is not limited, a thing from microorganism is used suitably.

[0017]It is not limited especially as a reduction type chromogen used for this invention. For example, a coupler and phenol, such as 4-aminoantipyrine and 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone, A phenol derivative or aniline, such as 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, and 2,4-dichlorophenol, A N,N-dimethyl- m-anisidine, N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-N'-acetylenediamine, N-ethyl- N-(beta-hydroxyethyl)- M-toluidine, N-ethyl- N-(hydroxy-3-sulfopropyl)- M-toluidine, N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine, N-ethyl-N-sulfopropyl 3,5-dimethoxyaniline, N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline, An N-ethyl-N-sulfopropyl m-anisidine, N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-N'-succinyl ethylenediamine, Combination [ of aniline derivatives such as an N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-anisidine, ], or 10-N-methylcarbamoyl 3,7-dimethylamino 10H-phenothiazine, a screw [3-bis(4-chlorophenyl)methyl-4-dimethylaminophenyl] Leuco coloring matter, such as amine and 4,4-bis(dimethylamino)diphenyl-(2,7-dihydroxy-1-naphthyl) methane, is mentioned.

[0018]An adenosine diphosphate salt and a phosphoenolpyruvic acid salt which are used for this invention are not limited especially if sodium ion is not included, but sodium salt, a trishydroxymethylaminomethane salt, a cyclohexylamine salt, etc. are mentioned. A reduction type nicotine ADENINJI nucleoside (NADH) and reduction type nicotine adenine dinucleoside phosphate (NADPH) in particular are not limited, and if they do not contain sodium ion, they can use anything.

[0019]As for pH of a reagent of this invention, it may be preferred to be kept at pH 6-9 with buffer solution, and as long as buffer solution does not contain sodium ion, what kind of thing may be sufficient as it. For example, triethanolamine buffer solution, GOOD buffer solution, and tris buffers are mentioned.

[0020]As occasion demands, a reagent of this invention may add a surface-active agent, an antiseptic, a stabilizing agent, an enzyme activator, etc. As a surface-active agent,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  and an antibiotic are suitably used as an antiseptic in which a nonionic surface active agent is used suitably. It will not be limited especially if effect is taken as a stabilizing agent and an enzyme activator. For example, albumin, FAD, magnesium ion, etc. are mentioned. It is more preferred to add chelating agents, such as crown ether and cryptand, and alkaline metal trapper and alkaline-earth-metals trapper in order to remove a metal ion which affects measurement.

[0021]Especially if enzyme concentration of a pyruvate kinase used for this invention is concentration suitable for measurement, it is not restricted, but it is suitably used in 0.01 - 10u/ml. Pyruvate oxidase is suitably used in 1 - 30u/ml. Glycerol kinase is suitably used in 0.05 - 50u/ml. Glycerol triphosphoric acid oxidase is suitably used in 0.1 - 50u/ml. Peroxidase is suitably used in 1 - 100u/ml. FOSUFO enal pin

bottle acid or its salt, adenosine diphosphate or its salt, and a reduction type chromogen. Especially if it is concentration suitable for measurement, it will not be restricted, but phosphoenolpyruvic acid or its salt is suitably used in the range of 0.5 – 5mM, and adenosine diphosphate or its salt is suitably used in the range of 1 – 20mM. A reduction type chromogen is suitably used in the range of 0.01 – 10mM. If it is concentration suitable for measurement, restriction in particular will not be carried out, but a reduction type nicotine ADENINJI nucleoside (NADH) and reduction type nicotine adenine dinucleoside phosphate (NADPH) are suitably used in the range of 0.005 – 0.5mM.

[0022]A method of measuring sodium ion using a constituent for sodium ion measurement of this invention, There is a method of making a chromogen, and the bottom of peroxidase coexistence and quinoid coloring matter generate, and carrying out the colorimetry of the  $H_2O_2$  which makes a sample react to a reagent containing a pyruvate kinase, glycerol kinase, and glycerol triphosphoric acid oxidase, and generates it like the above. It mixes from the beginning, and the constituent A and the constituent B of the 2nd invention may be used as a 1 liquid type reagent, or may be independently used as a 2 liquid type reagent. Although it does not regulate strictly in particular as conditions measured using a constituent of this invention, reaction temperature is preferred among 10–40 \*\*, and 25 \*\* or 37 \*\* are used. Reaction time, for 0 to 10 minutes is used suitably. It is desirable to be measured near  $\lambda_{max}$  of coloring matter to which it colored as a measured wavelength.

[0023]

[Example]

The sodium ion concentration in example 1 sample was measured with the following measuring methods. The same sample was measured with the electrode method as contrast.

Reagent A0.1M Triethanolamine HCl buffer solution . pH 7.60.1% Triton X-1005mM.  $MgCl_2$ 0.2M Glycerin 4mM. ADP0.7mM PEP tris salt 0.5mM 4-aminoantipyrine 2mM phenol 0.4u/ml pyruvate kinase 3.0u/ml Glycerol-kinase 10u/ml Glycerol triphosphoric acid oxidase 30u/ml Peroxidase [0024]Reagent B0.1M Triethanolamine HCl buffer solution . pH 7.60.1% Triton X-1005mM.  $MgCl_2$ 0.2M Glycerin 4mM. ADP0.7mM

PEP tris salt 0.5mM. 4-aminoantipyrine 2mM Phenol 0.4u/ml. Pyruvate kinase 3.0u/ml glycerol-kinase 10u/ml glycerol triphosphoric acid oxidase 30u/ml peroxidase 50mM Glucose 5mM \*\*ketoglutaric acid 0.2mM NADPH50u/ml. Glutamate dehydrogenase 10u/ml Glucose dehydrogenase [0025]The ten-step diluent of measuring method sodium chloride aqueous solution 200mM and ten steps of blood serum diluent are made into a sample, respectively, Extracted 40microeach l, added 4 ml of the above-mentioned reagents to this, and it was made to react for 10 minutes at 37 \*\*, and asked for the time course (action which the enzyme reaction is following in the measured wavelength) at 400 nm, and the absorbance variation for 1 minute. The blank used distilled water instead of sodium ion content sample liquid. The time course of a 200mM sodium chloride aqueous solution and a serum sample is shown in drawing 1, and the dilution linearity of a 200mM sodium chloride aqueous solution and a serum sample is shown in drawing 2 and drawing 3. Even if it uses a sodium chloride aqueous solution blood serum as a sample so that more clearly than a figure, in this invention, sodium ion can be measured correctly and easily in a short time. It measured similarly considering the ten-step diluent of ammonium chloride solution 200mM as a sample. The time course of a 200mM sodium chloride aqueous solution and 200mM ammonium chloride solution is shown in drawing 4 and drawing 5.

[0026]Table 1 and 2 shows the result of having measured each sample with the reagents A and B and an electrode method.

[Table 1]

	試薬 A	試薬 B	電極法
蒸留水	0mM	0mM	***
20mM NaCl	20.0mM	20.0mM	20.0mM
40mM NaCl	39.8mM	40mM	40mM
60mM NaCl	60.0mM	60.2mM	60.2mM
80mM NaCl	79.6mM	80.2mM	80.2mM
100mM NaCl	100.2mM	100mM	100mM
120mM NaCl	120.0mM	119.8mM	119.8mM
140mM NaCl	140.0mM	140.0mM	140.0mM
160mM NaCl	160.2mM	160mM	160mM
180mM NaCl	180.0mM	180.2mM	180.2mM
200mM NaCl	199.6mM	200mM	200mM
生血清	162.2mM	160.2mM	160.2mM

[0027]

[Table 2]

	試薬 A	試薬 B	電極法
蒸留水	0mM	0mM	***
20mM NH <sub>4</sub> Cl	31.2mM	0mM	***
40mM NH <sub>4</sub> Cl	61.6mM	0mM	***
60mM NH <sub>4</sub> Cl	93.6mM	0mM	***
80mM NH <sub>4</sub> Cl	121.0mM	0mM	1.2mM
100mM NH <sub>4</sub> Cl	158.4mM	0mM	1.4mM
120mM NH <sub>4</sub> Cl	191.2mM	0mM	1.6mM
140mM NH <sub>4</sub> Cl	220.0mM	0mM	1.8mM
160mM NH <sub>4</sub> Cl	249.6mM	0mM	1.9mM
180mM NH <sub>4</sub> Cl	300.0mM	0mM	2.0mM
200mM NH <sub>4</sub> Cl	311.6mM	0mM	2.1mM
生血清	165.2mM	160.2mM	160.2mM

[0028] Table 3 shows the result of having measured the sample which added a 200mM sodium chloride aqueous solution and the ammonium chloride solution of 200mM with the reagents A and B and an electrode method to a raw blood serum.

[Table 3]

	試薬 A・	試薬 B	電極法
① 生血清	165.2mM	160.2mM	160.2mM
② +20mM NaCl	185.2mM	180.2mM	180.2mM
⑤ +20mM NH <sub>4</sub> Cl	196.4mM	160.2mM	160.2mM

[0029]

[Effect of the Invention] According to this invention, the constituent for enzymatic measurement of the sodium ion concentration excellent in operativity, fixed-quantity nature, and accuracy is provided.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]The time course of a 200mM sodium chloride aqueous solution and a serum sample is shown.

[Drawing 2]The dilution linearity of a 200mM sodium chloride aqueous solution is shown.

[Drawing 3]The dilution linearity of a serum sample is shown.

[Drawing 4]The time course of the 200mM sodium chloride aqueous solution at the time of using the reagent A and the ammonium chloride solution of 200mM is shown.

[Drawing 5]The time course of the 200mM sodium chloride aqueous solution at the time of using the reagent B and the ammonium chloride solution of 200mM is shown.

---

[Translation done.]



## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

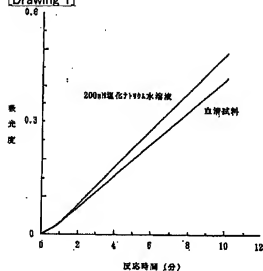
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

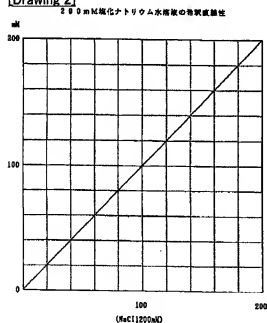
3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

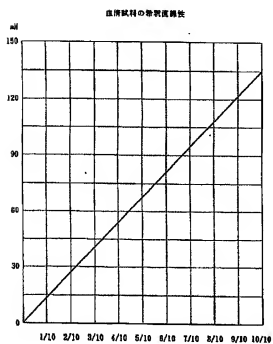
[Drawing 1]



[Drawing 2]

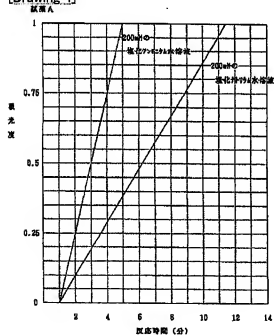


[Drawing 3]

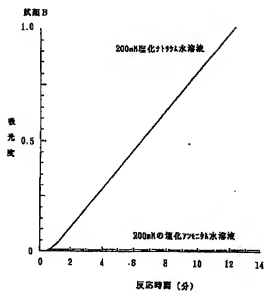


答数系列

[Drawing 4]



[Drawing 5]



---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-284997

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/48	Z	6807-4B	
	1/26		6807-4B	
	1/28		6807-4B	
	1/32		6807-4B	

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-83920	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成4年(1992)4月6日	(72)発明者	長尾 洋敏 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内
		(72)発明者	馬島 肇一 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内
		(72)発明者	手嶋 真一 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内

(54)【発明の名称】 ナトリウムイオン測定用組成物

(57)【要約】

【目的】 操作性、定量性、正確性に優れたナトリウムイオン濃度の酵素的測定用組成物を提供する。

【構成】 下記の組成物A又は組成物A及び組成物Bを含有してなることを特徴とするナトリウムイオン測定用組成物。

A

a) ビルビン酸キナーゼ、b) グリセロールキナーゼ、c) グリセロール三リン酸オキシダーゼ、d) ペルオキシダーゼ、e) 還元型色原体、f) アデノシン三リン酸またはその塩及びg) フォスフォエノールビルビン酸またはその塩を含有する組成物。

B

a) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、b) グルコースデヒドロゲナーゼ及びc) 還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド(NADH)または還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)を含有する組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) ビルビン酸キナーゼ、b) グリセロールキナーゼ、c) グリセロール三リン酸オキシダーゼ、d) ペルオキシダーゼ、e) 還元型色原体、f) アデノシン三リン酸またはその塩及びg) フォスフォエノールビルビン酸またはその塩を含有することを特徴とするナトリウムイオン測定用組成物。

【請求項2】 下記の組成物A及び組成物Bを含有してなることを特徴とするナトリウムイオン測定用組成物。

A

a) ビルビン酸キナーゼ、b) グリセロールキナーゼ、c) グリセロール三リン酸オキシダーゼ、d) ペルオキシダーゼ、e) 還元型色原体、f) アデノシン三リン酸またはその塩及びg) フォスフォエノールビルビン酸またはその塩を含有する組成物。

B

a) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、b) グルコースデヒドロゲナーゼ及びc) 還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド (NADH) または還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドリッド (NADPH) を含有する組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はナトリウムイオン測定用組成物に関するものである。体液中のナトリウムイオン測定は、水分および電解質代謝の失調をきたすような場合、すなわち、飢餓、発汗、熱射病、下痢、下体臓器皮膚系機能障害、心不全、腎不全、ネフローゼ症候群、ステロイドホルモン投与時、アシドーシスの有用な情報を与えるものとして臨床意義が深い。

## 【0002】

【従来の技術】従来、ナトリウムイオンを含めて金属イオンの測定法としては、炎光光度計法、化学的測定法、イオン選択電極法が用いられてきている。しかしながら、炎光光度計法は操作が煩雑であり、試料の処理能力に問題があった。化学的測定法は操作が煩雑な上に試薬が高価であるという問題があり、臨床検査の現場で実際には余り用いられていない。イオン選択電極法は、比較的操作简单であるが、電極の劣化のため測定時に誤差を生じるという問題がある。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記現状に鑑み、操作性、定量化、正確性に優れたナトリウムイオン濃度の酵素的測定用組成物を提供することである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ナトリウムイオンにより活性化される酵素を用いて検体中のナトリウムイオン濃度を測定する方法を鋭意検討したところ、ビルビン酸キナーゼを用いる反応により生じるアデノシン三リン酸を、グリセロールキナーゼ、グリセロ-

ール三リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼを用いて定量することが可能であることを見いだした。

【0005】すなわち、本発明の第1の発明の要旨は、a) ビルビン酸キナーゼ、b) グリセロールキナーゼ、c) グリセロール三リン酸オキシダーゼ、d) ペルオキシダーゼ、e) 還元型色原体、f) アデノシン三リン酸またはその塩及びg) フォスフォエノールビルビン酸またはその塩を含有することを特徴とするナトリウムイオン測定用組成物に存する。

10

【0006】この測定系を用いて試料を測定した場合、通常は何ら問題はないが過剰にアンモニウムイオンを添加すると正の影響があることがわかった。そこで、アンモニウムイオンの影響回避策を検討したところ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼを用いることにより、低濃度のアンモニウムイオンを有効に除去できることを見いだした。しかしながら、高濃度のアンモニウムイオンが添加された試料を測定する場合、完全にアンモニウムイオンを除去するためには、高濃度のNADHあるいはNADPHの添加が必要であることがわかった。NADHまたはNADPHは、還元作用を有するため、高濃度のNADHあるいはNADPHの存在はペルオキシダーゼを用いる発色反応系に負の影響を与え十分な感度を得られなくなる。

【0007】そこでさらに検討した結果、グルタミン酸デヒドロゲナーゼを用いる反応により酸化されるNADHあるいはNADPHをグルコースデヒドロゲナーゼを用いる反応に利用することが可能であることを見いだした。つまり、NADHあるいはNADPHをリサイクルさせることにより低濃度のNADHまたはNADPHを用いて高濃度のアンモニウムイオンを効果的に除去する反応系を完成するに至った。

30

【0008】さらに、このアンモニウムイオン除去反応系を、上記のナトリウムイオンの測定系に組み込むことにより、より正確性の高いナトリウムイオン測定系を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明の第2の発明の要旨は、下記の組成物A及び組成物Bを含有してなることを特徴とするナトリウムイオン測定用組成物に存する。

A

40

a) ビルビン酸キナーゼ、b) グリセロールキナーゼ、c) グリセロール三リン酸オキシダーゼ、d) ペルオキシダーゼ、e) 還元型色原体、f) アデノシン三リン酸またはその塩及びg) フォスフォエノールビルビン酸またはその塩を含有する組成物。

B

a) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、b) グルコースデヒドロゲナーゼ及びc) 還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド (NADH) または還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドリッド (NADPH) を含有する組成物。上記組成物Bは、アンモニウムイオン除去用の組成物で

50

あって、高濃度のアンモニウムイオンを効果的に消去することができる。

【0010】 ビルビン酸キナーゼを用いてナトリウムイオンを測定する方法としては、ビルビン酸キナーゼを用いる反応により生じるビルビン酸をビルビン酸オキシダーゼを利用し過酸化水素を生成させ色原体とペルオキシダーゼ共存下、キノイド色素を生成させ比色定量する方法があるが、この方法は、内因性のビルビン酸の影響を受けやすく、またビルビン酸オキシダーゼのコストが高いため、商業的に利用することが困難である。

【0011】 また本発明以外の組成物を用いてアンモニウムイオンを消去する方法としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼとイソクエン酸デヒドロゲナーゼを組合わせてアンモニウムイオンを消去する方法が挙げられるが、この方法においては有効にアンモニウムイオンを消去することができるもののイソクエン酸デヒドロゲナーゼ\*  
(ナトリウムイオン測定系)

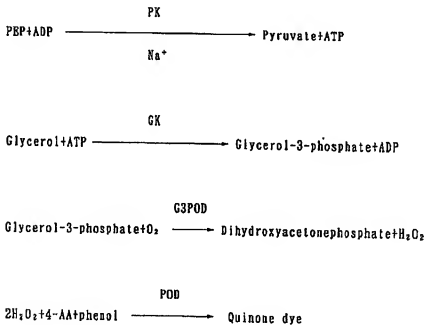
\*ゼの基質となるイソクエン酸がグルコースより高価であり、またイソクエン酸デヒドロゲナーゼの反応を停止するため、金属キレート剤の添加が必要であるが、金属キレート剤の添加はナトリウムイオンの測定に負の影響を与えるため、ナトリウムイオンの測定に留まらず金属イオンの測定においてはできかぎり添加を制限する必要がある。

【0012】 したがって、ナトリウムイオン測定においてこれらの方法の利用は商業的に困難であり、本発明の組成物を用いてナトリウムイオンを測定する方法が、正確性、精度、簡便性、コスト的に優れている。

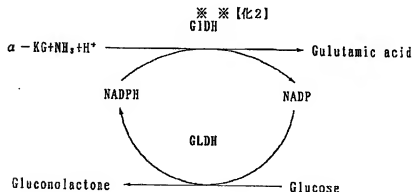
【0013】 上記の組成物を利用して、試料中のナトリウムイオンを測定する方法としては以下に例示される反応系を利用するものが挙げられる。

【0014】

【化1】



【0015】



5

PEP フォスフォエノールピルビン酸  
 GK グリセロールキナーゼ  
 ADP アデニンジフォスフェート  
 G3POD グリセロール三リン酸オキシダーゼ  
 ATP アデニン三リン酸フォスフェート  
 POD ペルオキシダーゼ  
 4-AA 4-アミノアンチピリン  
 GLDH グルタミン酸デヒドロゲナーゼ  
 α-KG α-ケトグルタル酸  
 GLDH グルコースデヒドロゲナーゼ  
 PK ビルビン酸キナーゼ

【0016】本発明に用いられるビルビン酸キナーゼの起源は特に限定されるものではなく、例えばウサギ筋肉あるいは牛の筋肉より得られるものを用いてよい。好適にはウサギ筋肉由来のものが用いられる。本発明に用いられるグリセロールキナーゼの起源は特に限定されるものではなく、例えばカンジダ マイコデルマ(*Candida mycoderma*)由来のものとヤセルモナス エスピー(*Cellulomonas* sp.)由来のものが用いられる。好適には、*Cellulomonas* sp. 由来のものが用いられる。本発明に用いられるグリセロール三リン酸オキシダーゼの起源は特に限定されるものではないが、好適には微生物由来のものが用いられる。本発明に用いられるペルオキシダーゼの由来は特に限定されるものではないが、好適には西洋ワサビ由来のものが用いられる。本発明に用いられるグルタミン酸デヒドロゲナーゼの起源は特に限定されるものではなく細菌、酵母、牛の肝由来のものが用いられるが、好適には細菌由来のものが用いられる。本発明に用いられるグルコースデヒドロゲナーゼの起源は特に限定されるものではないが、好適には微生物由来のものが用いられる。

【0017】本発明に用いられる還元型色原体としては、特に限定されるものではない。例えば4-アミノアンチピリン、3-メチル-2-ベンゾチアゾリニドドラゾン等のカップラーとフェノール、2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2, 4-ジクロロフェノール等のフェノール誘導体もしくはアニリン、N、N-ジメチル-m-アニシジン、N-エチル-N- (3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N- (β-ヒドロキエチル)-m-トルイジン、N-エチル-N- (ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-N-エチル-N- (ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N- (3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン、N-エチル-N- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N- (3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン、N-エチル-N- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン等のアニリン誘導体の組合せ、または10-N-

6

メチルカルバモイル-3, 7-ジメチルアミノ-10-H-フェノチアジン、ビス [3-ビス (4-クロロフェニル) メチル-4-ジメチルアミノフェニル] アミン、4, 4-ビス (ジメチルアミノ) ジフェニル (2, 7-ジヒドロキシ-1-ナフチル) メタン等のロイコ色素が挙げられる。

【0018】本発明に用いられるアデニン三リン酸塩、フォスフォエノールピルビン酸塩は、ナトリウムイオンを含んでいないものなら特に限定されず、ナトリウム塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩、シクロヘキシルアミン塩等が挙げられる。還元型ニコチンアデニンジヌクレオシド (NADH)、還元型ニコチンアデニンジヌクレオシドリン酸 (NADPH) は特に限定されるものでなく、ナトリウムイオンを含有していないものなら如何なるものでも使用することができる。

【0019】本発明の試薬のpHは緩衝液により、pH 6~9に保たれているのが好ましく、緩衝液はナトリウムイオンを含有しないものであればいかなるものでもよい。例えばトリエタノールアミン緩衝液、GOOD緩衝液、トリス緩衝液が挙げられる。

【0020】本発明の試薬は必要により、界面活性剤、防腐剤、安定化剤、酵素賦活剤等を加えてもよい。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤が好適に用いられる防腐剤としては、NaNO<sub>2</sub>、抗生物質が好適に用いられる。安定化剤、酵素賦活剤として効果を示すものであれば特に限定されない。例えばアルブミン、FAD、マグネシウムイオン等が挙げられる。また、測定に影響を与える金属イオンを除去する目的で、クローンエーデルやクリプタンド等のキレート剤や、アルカリ金属トラッパー、アルカリ土類金属トラッパーを添加することがより好ましい。

【0021】本発明に用いられるビルビン酸キナーゼの酵素濃度は測定に適した濃度であれば特に制限されるものではないが、0. 01~10 μm/l の範囲で好適に用いられる。ビルビン酸オキシダーゼは、1~30 μm/l の範囲で好適に用いられる。グリセロールキナーゼは、0. 05~50 μm/l の範囲で好適に用いられる。グリセロール三リン酸オキシダーゼは、0. 1~50 μm/l の範囲で好適に用いられる。ペルオキシダーゼは、1~100 μm/l の範囲で好適に用いられる。フォスフォエノールピルビン酸またはその塩、アデニン三リン酸またはその塩、還元型色原体は、測定に適した濃度であれば特に制限されるものではないが、フォスフォエノールピルビン酸またはその塩は0. 5~5 mM の範囲で好適に用いられ、アデニン三リン酸またはその塩は1~20 mM の範囲で好適に用いられる。還元型色原体は0. 01~10 mM の範囲で好適に用いられる。還元型ニコチンアデニンジヌクレオシド (NADH)、還元型ニコチンアデニンジヌクレオシドリン酸 (NADPH) は測定に適した濃度であれば特に制限されない

が好適には、0.005～0.5mMの範囲で用いられる。

【0022】本発明のナトリウムイオン測定用組成物を用いて、ナトリウムイオンを測定する方法は、前記のごとく試料をビルビン酸キナーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール三リン酸オキシダーゼ、を含有する試薬と反応させて生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を色原体とペルオキシダーゼ共存下、キノイド色素を生成させ比色定量する方法がある。また本第2発明の組成物Aと組成物Bは最初から混合しておいて一液型の試薬として使用してもよいし、あるいは別々に二液型の試薬として使用してもよい。本発明の組成物を用いて測定する条件としては、特に厳密に規制するものではないが、反応温度は、10～40℃の間で好ましくは25℃あるいは37℃が用いられる。反応時間は、0～10分の間が好適に用いられる。測定波長としては発色した色素のλ<sub>max</sub>付近で測定されることが望ましい。

#### 【0023】

##### 【実施例】

##### 実施例1

試料中のナトリウムイオン濃度を以下の測定法により測定した。また、対照として電極法で同一サンプルを測定した。

##### 試薬A

0.1M	トリエタノールアミン-HCl緩衝液
pH 7.6	
0.1%	Triton X-100
5mM	MgCl <sub>2</sub>
0.2M	グリセリン
4mM	ADP
0.7mM	PEPトリス塩
0.5mM	4-アミノアンチピリン
2mM	フェノール
0.4u/ml	ビルビン酸キナーゼ
3.0u/ml	グリセロールキナーゼ
1.0u/ml	グリセロール三リン酸オキシダーゼ
3.0u/ml	ペルオキシダーゼ

##### 【0024】試薬B

0.1M	トリエタノールアミン-HCl緩衝液
------	-------------------

液 pH 7.6

0.1%	Triton X-100
5mM	MgCl <sub>2</sub>
0.2M	グリセリン
4mM	ADP
0.7mM	PEPトリス塩
0.5mM	4-アミノアンチピリン
2mM	フェノール
0.4u/ml	ビルビン酸キナーゼ
3.0u/ml	グリセロールキナーゼ
1.0u/ml	グリセロール三リン酸オキシダーゼ
3.0u/ml	ペルオキシダーゼ
50mM	グルコース
5mM	α-ケトグルタル酸
0.2mM	NADPH
5.0u/ml	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
1.0u/ml	グルコースデヒドロゲナーゼ

##### 【0025】測定方法

塩化ナトリウム水溶液200mMの10段階希釈液と血清10段階希釈液をそれぞれ試料とし、各40μlを採取し、これに上記試薬4mlを加えて、37℃で10分間反応させて、400nmにおけるタイムコース（測定波長において、酵素反応が進んでいる挙動）と1分間の吸光度変化を求めた。なお、ブランクはナトリウムイオン含有緩衝液の代わりに蒸留水を用いた。図1に200mM塩化ナトリウム水溶液と血清試料のタイムコースを、図2及び図3に200mM塩化ナトリウム水溶液と血清試料の希釈直線性を示す。図より明らかなように、塩化ナトリウム水溶液血清を試料として用いても、本発明では短時間に正確かつ簡単にナトリウムイオンを測定することができる。さらに、塩化アンモニウム水溶液200mMの10段階希釈液を試料として同様に測定を行った。図4及び図5に200mM塩化ナトリウム水溶液と200mM塩化アンモニウム水溶液のタイムコースを示す。

【0026】表1及び表2は各サンプルを試薬A、B及び電極法で測定した結果を示す。

##### 【表1】



	試案 A	試案 B	電極法
蒸留水	0mM	0mM	***
20mM NaCl	20.0mM	20.0mM	20.0mM
40mM NaCl	39.8mM	40mM	40mM
60mM NaCl	60.0mM	60.2mM	60.2mM
80mM NaCl	79.6mM	80.2mM	80.2mM
100mM NaCl	100.2mM	100mM	100mM
120mM NaCl	120.0mM	119.8mM	119.8mM
140mM NaCl	140.0mM	140.0mM	140.0mM
160mM NaCl	160.2mM	160mM	160mM
180mM NaCl	180.0mM	180.2mM	180.2mM
200mM NaCl	199.6mM	200mM	200mM
生血清	162.2mM	160.2mM	160.2mM

【0027】

【表2】

	試薬 A	試薬 B	電極法
蒸留水	0mM	0mM	***
20mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	31.2mM	0mM	***
40mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	61.6mM	0mM	***
60mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	93.6mM	0mM	***
80mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	121.0mM	0mM	1.2mM
100mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	158.4mM	0mM	1.4mM
120mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	191.2mM	0mM	1.6mM
140mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	220.0mM	0mM	1.8mM
160mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	249.6mM	0mM	1.9mM
180mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	300.0mM	0mM	2.0mM
200mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	311.6mM	0mM	2.1mM
生血清	165.2mM	160.2mM	160.2mM

【0028】表3は生血清に200mM塩化ナトリウム \*。

水溶液と200mMの塩化アンモニウム水溶液を添加し 【表3】

たサンプルを試薬A、B及び電極法で測定した結果を示\*

	試薬 A	試薬 B	電極法
①生血清	165.2mM	160.2mM	160.2mM
②+20mM $\text{NaCl}$	185.2mM	180.2mM	180.2mM
⑤+20mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	196.4mM	160.2mM	160.2mM

【0029】

【発明の効果】本発明によれば、操作性、定量性、正確 40  
性に優れたナトリウムイオン濃度の酵素的測定用組成物  
が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】200mM塩化ナトリウム水溶液と血清試料の  
タイムコースを示す。

【図2】200mM塩化ナトリウム水溶液の希釈直線性

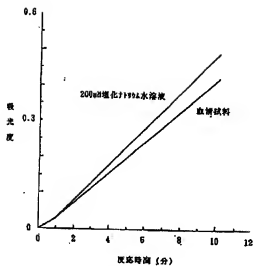
を示す。

【図3】血清試料の希釈直線性を示す。

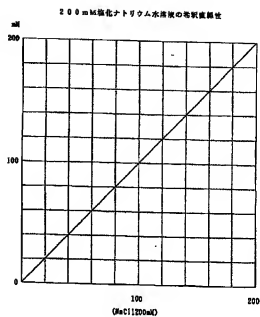
【図4】試薬Aを使用した場合の200mM塩化ナトリ  
ウム水溶液と200mMの塩化アンモニウム水溶液のタ  
イムコースを示す。

【図5】試薬Bを使用した場合の200mM塩化ナトリ  
ウム水溶液と200mMの塩化アンモニウム水溶液のタ  
イムコースを示す。

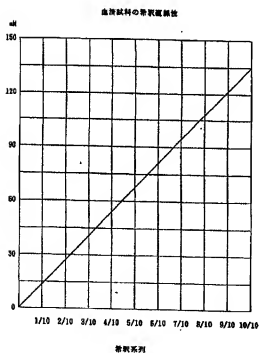
【図1】



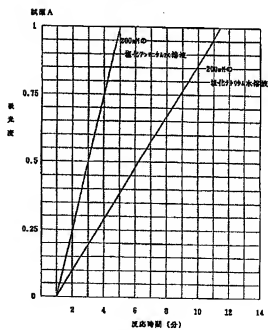
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

